

# 제대혈액에서 골조직 특이세포로의 분화

가톨릭대학교 의과대학 <sup>1</sup>미생물학교실, <sup>2</sup>병리학교실, <sup>3</sup>히스토스템

홍승진<sup>1</sup> · 이은아<sup>3</sup> · 채규태<sup>2</sup> · 한 훈<sup>1</sup>

## Differentiation of Osteoblast Progenitor Cells from Human Umbilical Cord Blood

Seung-Jin Hong<sup>1</sup>, Eun-A Lee<sup>3</sup>, Gue-Tae Chae<sup>2</sup> and Hoon Han<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Microbiology and Immunology, <sup>2</sup>Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, <sup>3</sup>Histostem Corporation, Seoul, Korea

### ABSTRACT

**Background:** Human umbilical cord bloods, which could be taken during the delivery are utilized as a source of hematopoietic stem cells. Also in cord blood, there are several kinds of stem cells such as endothelial and mesenchymal stem cells. **Methods:** We isolated the mesenchymal stem cells from human umbilical cord bloods and confirmed the differentiation of these cells into osteoblast progenitor cells. The mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood have the ability to differentiate into specific tissue cells, which is one of characteristics of stem cells. These cells were originated from the multipolar shaped cells out of adherent cells of the umbilical cord blood mononuclear cell culture. **Results:** The mesenchymal stem cells expressed cell surface antigen CD13, CD90, CD102, CD105,  $\alpha$ -smooth muscle actin and cytoplasmic antigen vimentine. Having cultrued these cells in bone formation media, we observed the formation of extracellular matrix and the expression of alkaline phosphatase and of mRNA of *cbfa-1*, osteocalcin and type I collagen. **Conclusion:** From these results we concluded that the cells isolated from the umbilical cord blood were mesenchymal stem cells, which we could differentiate into osteoblast when cultured in bone formation media. In short, it is suggested that these cells could be used as a new source of stem cells, which has the probability to alternate the embryonic stem cells. (*Immune Network* 2002;2(3):166-174)

**Key Words:** Human umbilical cord blood, mesenchymal stem cells, osteoblast progenitor cell

### 서론

줄기세포란 자기 스스로 증식할 수 있는 능력과 특이 조직으로의 분화가능성이 있는 세포들을 총칭한다(1). 이런 줄기세포는 아직까지 그 특성이 명확히 정의되지 않아서 증식능력과 특이조직으로 분화되는 것을 확인함으로써 증명할 수 있다. 줄기세포는 그 공급원에 따라서 배아줄기세포, 신생아줄기세포, 성인줄기세포 등으로

분류한다. 배아줄기세포는 신경세포, 조혈세포, 인슐린 분비세포 등 다양한 세포로의 분화능력이 뛰어나면서도 윤리적, 도덕적인 문제가 있으며, 이식 시에 기형종(teratoma)과 같은 종양세포로의 형질변환 가능성이 있다(2,3). 성인줄기세포의 경우 신경줄기세포, 피부줄기세포, 조혈줄기세포, 중간엽 줄기세포 등이 있으며 성인 골수에서 얻은 중간엽 줄기세포의 경우 조골세포, 연골세포, 지방세포 등으로 분화가 가능한 것으로 알려져 있다(4). 제대혈에는 조혈줄기세포 뿐만 아니라 혈관내피 줄기세포, 조혈작용의 지지줄기세포(5)가 있는 것으로 알려져 있으며 중간엽 줄기세포 또한 존재한다고(6) 알려져 있다.

중간엽 줄기세포에 대한 연구는 1970년대 Friedenstein

책임저자 : 한 훈, 가톨릭대학교 의과대학 미생물학교실  
☎ 137-701, 서울특별시 서초구 반포동 505번지  
Tel: 02-590-1218, Fax: 02-594-7355  
E-mail: cbib@catholic.ac.kr

이 연구는 보건복지부 과제(01-PJ10-PG8-01EC01)에 의해서 시행되었음.

등(7)이 골수에서 처음 시작하였으며 1990년대 초반부터 동물실험에 의한 연구가 본격적으로 진행되었다. 최근에는 골수(8), 지방조직(9), 근육세포(10) 등 다양한 조직에서 중간엽줄기세포를 얻을 수 있는 것으로 되어 있으며 이 중간엽줄기세포는 조골세포, 연골세포, 신경세포, 근육세포 등으로 분화가 가능한 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 제대혈에서 중간엽 줄기세포로 추정되는 세포를 분리한 후 스스로 증식하는 능력(self-renewal)이 있음을 관찰하고 골형성 유도배지를 가하여 골조직 특이세포로 분화됨을 확인하여 분리한 세포가 줄기세포임을 증명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**제대혈에서 중간엽줄기세포의 분리 및 배양.** 가톨릭 제대혈은행에서 얻은 제대혈 11개를 phosphate buffered saline (PBS, Jeil Biotechservices, Korea)로 2배 희석한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다(Hanil centrifugator Unicon 32R, Korea). Buffy coat층을 얻어서 다시 2배 희석하고 Ficoll-Hypaque (비중 1.077)를 사용하여 밀도구배원심분리방법으로 단핵세포를 분리하였다. PBS로 2회 세척 후 항생항균제(1,000 units/ml penicillin G, 1,000µg/ml streptomycin sulfate, 0.25µg/ml amphotericin B) 및 2 mM 글루타민(L-glutamine)이 함유된 minimum essential medium alpha modification (α-MEM, Jeil Biotechservices)에 fetal bovine serum (FBS, biofluids, USA)이 20% 되게 가한 배지로 세포를 부유시켜서 세포배양 플라스크(T25 and T75, Falcon, Becton Dickinson, USA)에  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 되게 넣어 37°C 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 배양 후 세포의 상태를 위상차현미경(Inverted phase contrast microscopy, Olympus, CK40, Japan)으로 확인하였다. 7일째 상층세포를 제거하였으며 붙어서 자라는 세포가 플라스크 바닥을 채우면 1% trypsin EDTA를 처리하여 세포를 부유시킨 후 2회 세척하고  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 되게 다시 배양하였다. 배지는 1주일에 2회 교환하였다.

**골조직 특이세포 분화.** 세포배양 플라스크에 붙어서 자라는 방추형세포가 일정한 군락을 이루게 되면 20% FBS가 함유된 α-MEM배지와 0.1µM Dexamethasone, 10 mM β-glycerophosphate, 50µM ascorbate가 함유된 골형성 유도배지에서 각각 배양하였다. 1일 1회씩 형태학적인 변화를 관찰하였으며 trypsin을 처리하여 세포를 분리한 후 성장을 확인하였다.

**Immunophenotyping.** Fluorescence activated cell sorter (FACS, Calibur, Becton Dickinson, USA)를 사용하여 세포 표면항원과 세포내항원을 확인하였다. 세포표면 항원의 처리는 3번째 계대배양 후 세포배양 플라스크에 붙어서 자라는 흡착세포에 trypsin을 가한 뒤 2% FBS가 함유된 Hank's Balanced Salt Solution (HF2)으로 2회 세척하고

5 ml tube에 분주하여 100µl HF2를 넣고 항체를 첨가하였다. 항체는 isotype FITC와 PE, CD13PE, CD14PE, CD34FITC와 PE, CD45PE, CD51/61FITC, CD90FITC, CD105PE (Pharmingen, Becton Dickinson, USA), CD102 (serotec, UK), α 평활근 actine (Sigma, USA)을 사용하였으며 4°C에서 30분간 처리하였다. 이차 항체가 필요한 경우 HF2로 2회 세척하고 100µl HF2에 1/300로 희석한 anti-mouse Ig GAM-FITC (ICN)을 4°C에서 30분간 처리하였다. HF2로 2회 세척 후 Propidium Iodide 1µg/ml를 사용하여 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분하였다. 세포내 항원처리하는 중간엽 줄기세포의 경우 먼저 세포표면을 4°C에서 30분간 CD13PE로 처리한 후 1% paraformaldehyde로 10분간 고정시키고 HF2에 IC Perm (Biosource, PB 001, 5x, saponine, FBS, 0.1% sodium azide)을 다섯 배로 희석시킨 용액을 사용하였다. 일차 항체에 CD90, CD105, Collagen type I, Collagen type II (Sigma), Vimentin (Santa Curze, USA)를 사용하고 이차 항체는 anti-mouse Ig GAM-FITC (ICN)을 1/300로 희석하여 사용하였다.

**면역형광염색.** 세포배양 플라스크에 붙어서 자라는 세포를 trypsin으로 처리한 후 8 chamber slide에  $1 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 200µl를 가하여 슬라이드 표면에 붙여서 배양하였다. 세포표면 항원의 관찰은 먼저 chamber 슬라이드의 상층액을 제거한 다음 PBS로 2회 세척하고 1% para-formaldehyde로 4°C에서 10분간 고정한 뒤 HF2를 가하여 상온에서 20분간 반응시킨 후 Immunophenotyping과 같은 방법으로 염색하였다. 세포질내 항원은 표면항원의 염색과정 없이 바로 염색을 실시하며 HF2-IC Perm용액을 사용하여 세포표면항원 관찰 시와 동일한 방법을 사용하였다. 염색 후 chamber를 분리하고 고무막을 제거한 뒤 커버슬라이드를 덮고 형광현미경(Zeiss, Deutch)으로 관찰하였다.

**Alkaline phosphatase 염색 및 activity 확인.** 세포배양 플라스크의 상층액을 제거한 후 PBS로 2회 세척하고 2% para-formaldehyde/0.1 M cacodylic acid로 10분간 고정하였다. 고정액을 제거한 뒤 0.1 M cacodylic acid 2 ml로 세척하고 Fast red TR/Naphthol Ax-Mx, formamide, 0.2 M Tris maleate을 조합한 alkaline phosphatase확인 시약 2 ml를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 제거하고 0.1 M cacodylic acid 2 ml로 반응을 정지시킨 후 육안과 위상차 현미경으로 확인하였다.

**mRNA의 발현 확인.** RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (Qiagen, USA)을 사용하여 세포에서 RNA를 분리하였다. 약술하면 세포에 trypsin을 가하여 분리한 후  $2 \times 10^5$  cells로 맞추고 PBS로 4회 세척하였고 여기에 1 ml RNeasy lysis buffer 용액에 10µl β-mercaptoethanol을 넣은 용액 350µl를 가하여 세포막을 용해시킨 후 QIAshredder 컬럼에 시료를 넣고

2분간 원심분리하였다. 걸러진 세포용해액에 70% ethanol 350 $\mu$ l를 가하고 잘 섞은 뒤 RNeasy 컬럼에 넣어 8,000 $\times$  g로 15초간 원심분리하였다. 세포용해액을 버리고 700 $\mu$ l의 RW1 용액을 가한 뒤 8,000 $\times$  g에서 15초간 원심분리하였다. 채취튜브를 교체하고 RPE 용액 500 $\mu$ l를 넣고 8,000 $\times$  g에서 15초간 원심분리한 후 세포용해액을 버리고 RPE 용액 500 $\mu$ l를 가하여 8,000 $\times$  g에서 2분간 원심분리하였다. RNeasy 컬럼을 새로운 채취튜브로 옮기고 RNase-free 증류수 30 $\mu$ l를 넣고 8,000 $\times$  g에서 1분간 원심분리하여 RNA추출물을 얻었다. RNA 8 $\mu$ l과 10 mM dNTP 1 $\mu$ l, Oligo (dT) 12~18 (0.5 g/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l를 섞은 뒤 65°C에서 5분간 반응시킨 후 1분간 냉장처리하고 10 $\times$  RT buffer 2 $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, 0.1 M DTT 2 $\mu$ l, RNase OUT Recombinant RNase Inhibitor 1 $\mu$ l를 가하여 42°C에서 2분간 반응시킨다. 여기에 RTase (50 units, Superscript II) 1 $\mu$ l를 가한 뒤 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시키고 RNase H 1 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 20분간 방치하여 mRNA를 제거하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)은 다음과 같이 시행하였다. 20 $\mu$ l의 반응에 10 $\times$  buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>); 각각의 oligonucleotide primers 1 pM; 2 $\mu$ M dNTP; 100 ng cDNA; 0.5 U Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l; Boehringer Mannheim, Deutch)를 사용하였다. PCR은 Perkin Elmer 9,600 thermocycler를 이용하여 95°C에서 10분, 94°C (denaturation)에서 1분, 55°C (annealing)에서 1분, 72°C (elongation)에서 1분간 30회 반복하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose-gel에서 전기영동을 하였으며, ethidium bromide로 염색 확인하였다. 이 때 사용한 primer들은 Table I과 같다.

## 결 과

**제대혈에서 일차분리한 접착성세포의 성장.** 제대혈에서 분리한 단핵세포를 배양하면 2일째부터 플라스크 바닥에 붙어 자라는 세포가 관찰되며 3~4일째부터 군락을 이루어 여러 형태를 가진 세포로 자라는 것이 확인되었다. 7일째 상층세포를 제거하고 2주일이 경과하면서 여러 가지 형태의 접착성 세포들을 관찰하였다. 11개의 제대혈 중 1개의 단핵세포 분리 군에서 방추형세포가 빠르게 증식하면서 군락을 형성하며 3주가 경과되면서 방추형 세포 군을 형성하였다. 방추형세포들은 다른 세포들에 비해서 trypsin 처리에 잘 반응하여 쉽게 부유되었으며 제대배양을 시행할수록 동일한 형태를 갖는 세포군이 형성되었다(Fig. 1 A, B, C, D).

**골형성 유도 배지에서의 변화.** 방추형세포에 골형성 유도배지를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 관찰한 결과 골형성 유도배지에서 배양하였을 때 세포의 가장자리가 날카로워 지면서 세포외 기질을 만들어 내었으며 증식속도가 상대적으로 감소함을 확인하였다. 배지 처리 15일이 경과하면서 골형성 유도배지 처리군은 trypsin처리에 반응하지 않아 세포의 성장을 확인하지는 못하였으며 계속적으로 기질이 생성되어 배양용기 바닥이 전부 덮일 때까지 증식하며 세포가 사멸하는 과정이 진행되었다(Fig. 1 E, F).

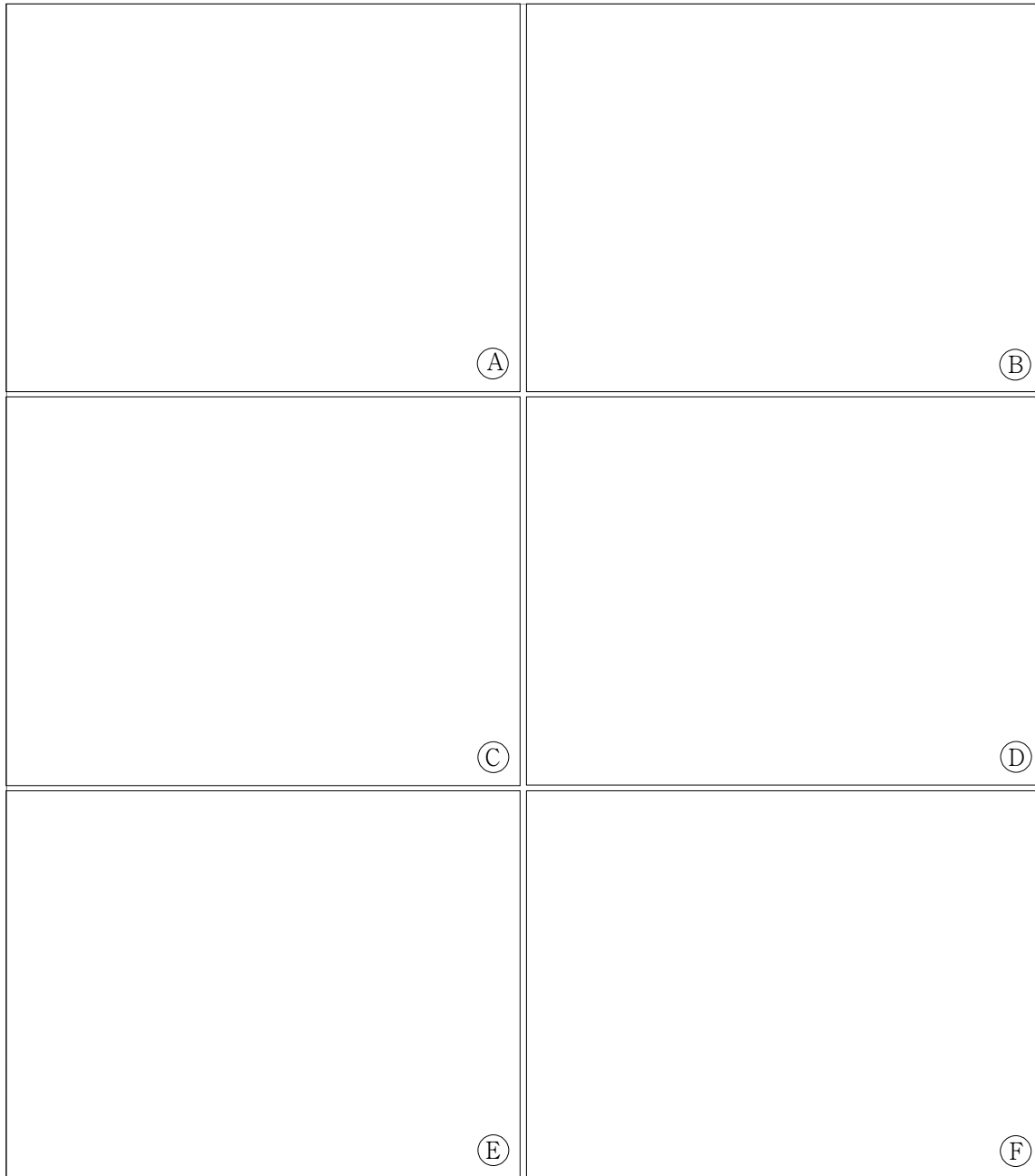
**Immunophenotyping.** 방추형세포의 세포표면 항원을 FACS로 분석한 결과 조혈줄기세포의 특징적인 표식자인 CD34와 과립구 계통의 공통 항원인 CD45, 호중구에 특이한 CD14는 확인되지 않았으며, CD13, CD90, CD102, CD105,  $\alpha$ -평활근 actin은 확인되었고 이들 항원은 골수에서 분리한 중간엽 줄기세포에서 발현되는 항원들(11)

**Table I.** Name and nucleotide sequences of the primers

Primer	Sequences	Tm°C	Bp
GAPDH <sup>1</sup> sense	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	55	452
GAPDH anti-sense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	55.9	
ALP <sup>2</sup> sense	5'-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3'	48.8	475
ALP anti-sense	5'-CTGGTAGGCGATGTCTCTTA-3'	49.8	
Type I collagen sense	5'-TGACGAGACCAAGAAGCTG-3'	45.2	599
Type I collagen anti-sense	5'-CCATCCAAACCACTGAAACC-3'	53.8	
<i>Cbfa-1</i> sense	5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'	65.5	267
<i>Cbfa-1</i> anti-sense	5'-CGCTCCGGCCCAAAATCTC-3'	63.3	
Osteocalcin sense	5'-CCTGAAAGCCGATGTGGTC-3'	71	262
Osteocalcin anti-sense	5'-CTCACACTCCTCGCCCTAT-3'	68	

1: Glycerophosphatase dehydrogenase, 2: Alkaline phosphatase

이다. 세포내 항원으로서는 지지세포의 세포골격을 형



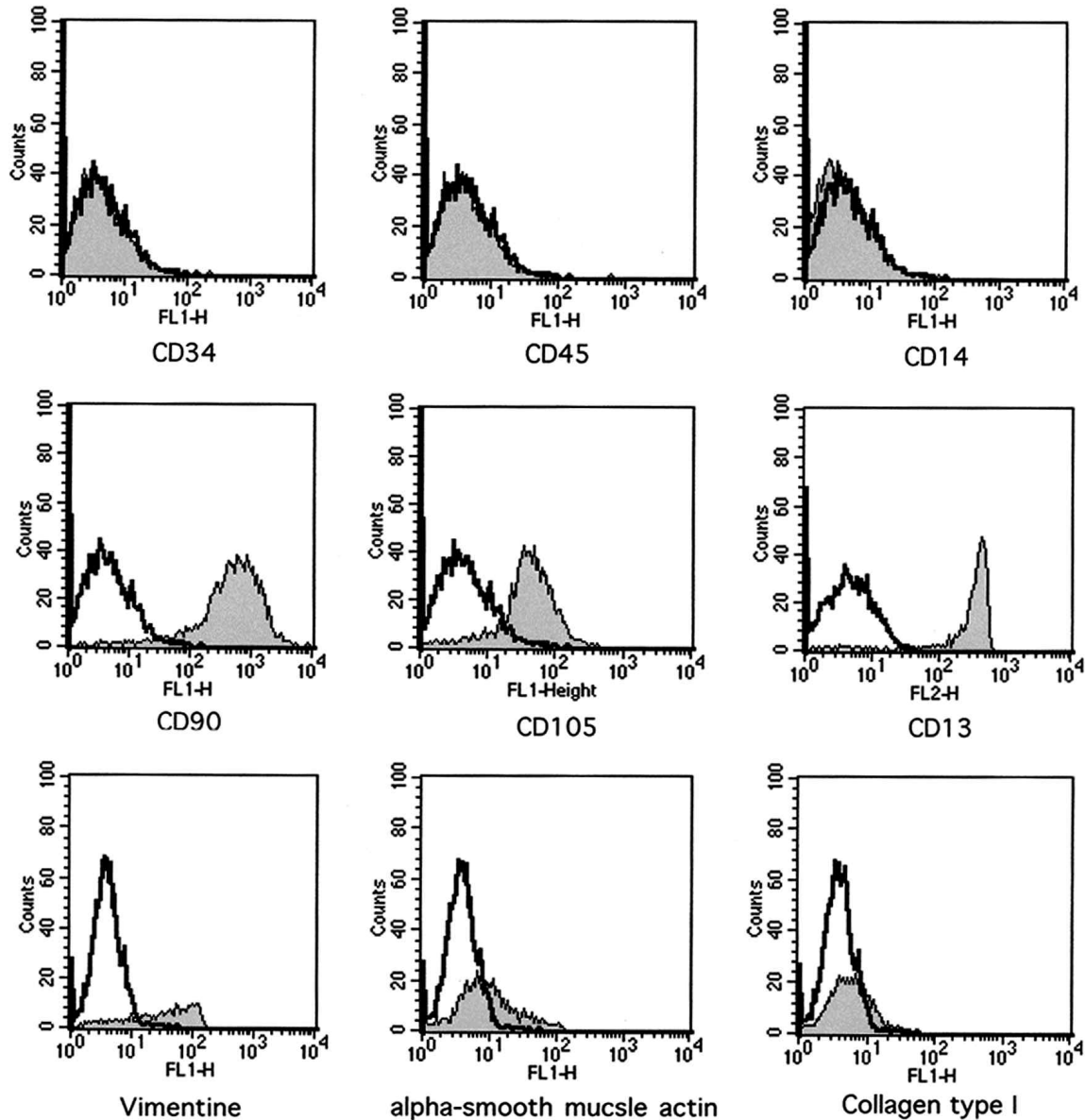
**Figure 1.** Morphologies of adherent mononuclear cells obtained from human umbilical cord blood. A. After 6 days of culture, suspension and adhesion cells were found ( $\times 100$ ), B. After 17 days of culture, spindle shaped cells grew rapidly ( $\times 100$ ), C. Culture 3 wks. The spindle shaped cells grew confluent and filled up the flask ( $\times 100$ ), D. Culture 1 month. The spindle shaped cells grew up to form multilayer ( $\times 100$ ), E. Treated with bone formation media for 2 wks. ( $\times 100$ ), F. Treated with bone formation media for 1 month. Massive matrix formation could be seen. ( $\times 100$ ).

성하는 Vimentine이 발현되었다(Fig. 2).

**면역형광염색.** 방추형세포에서 세포표면 항원인 CD90, CD105, CD102, CD13,  $\alpha$ -평활근 actine이 발현되었고 세포내 항원인 Vimentin의 세포골격구조도 확인하였다. 골형성 유도배지를 처리한 군에서는 제 1형 콜라겐이 점상의 형태로 세포질 내에 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

**Alkaline phosphatase의 발현.** 방추형세포를 골형성 유도배지로 배양한 군에서 alkaline phosphatase염색 결과 갈색으로 강하게 발현함을 확인하였다(Fig. 4).

**방추형 세포의 mRNA 발현 확인.** 방추형세포에서 계대 배양 3번째에서 골형성 유도배지를 처리하지 않은 군과 처리한 후 날짜별로 mRNA 발현을 비교하였으며 mRNA

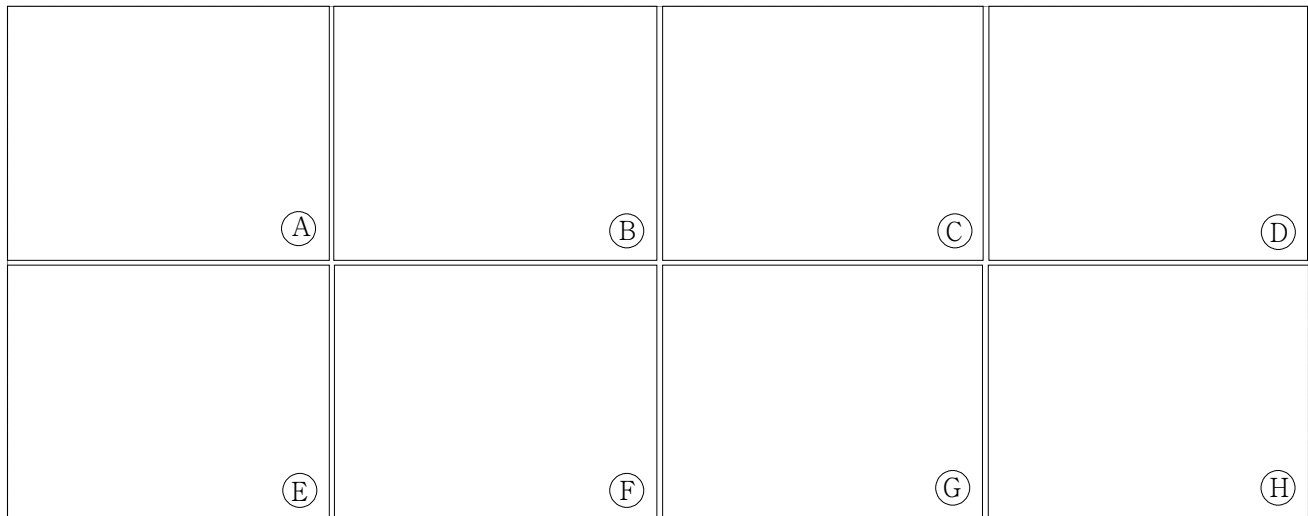


**Figure 2.** FACS results of spindle shaped cells. The CD34, CD45, CD14 were not expressed and the CD90, CD105, CD13 were expressed. The stromal cell cytoskeleton vimentine, and alpha-smooth muscle actine were expressed. Collagen type I could not be defined by cytoplasmic staining. Control, isotype antibody treated group without bone formation media.

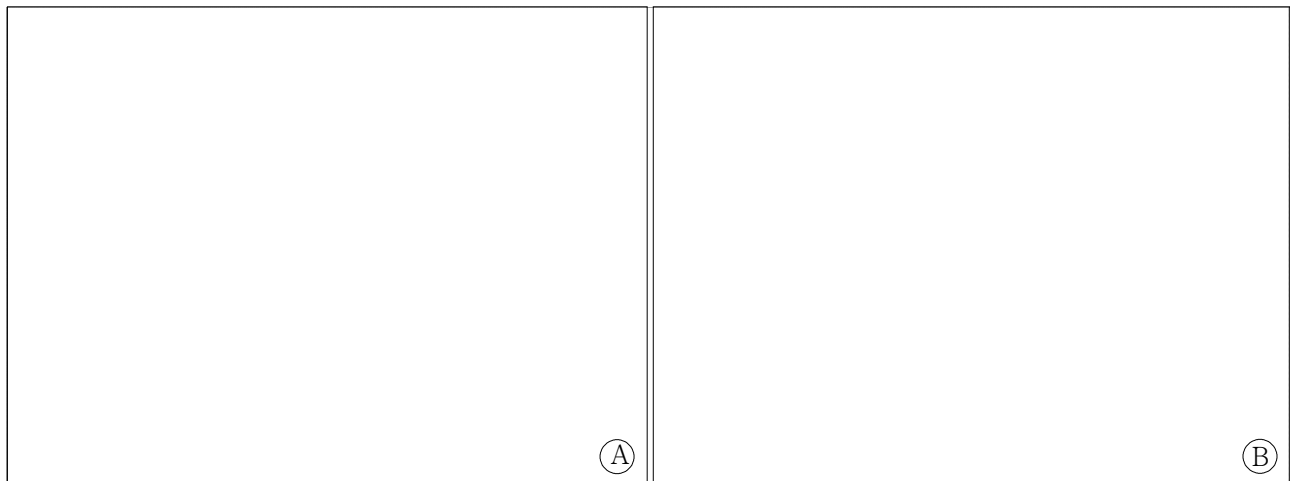
발현의 양적인 비교를 하기 위하여 동일한 수의 세포를 사용하여 alkaline phosphatase, 제1형 콜라젠, *cbfa-1*, 및 osteocalcin의 형별을 지배하는 mRNA의 발현을 RT-PCR로 확인하였다. Alkaline phosphatase는 골형성 유도배지를 처리한 군이 처리하지 않은 군에서 모두 발현되었다. 제1형 콜라젠은 골형성처리군과 비처리군에서 모두 발현되었으나 처리군에서 1일째 더 많은 증가양상을 보여주었다. *cbfa-1*은 처리군에서는 1일째부터 증가하는 양상을 보여주었다. Osteocalcin은 처리군과 비처리군에서 동일하게 발현되었다(Fig. 5).

## 고 찰

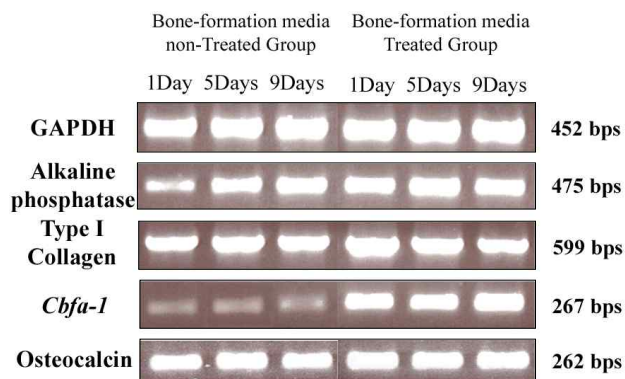
줄기세포는 자기증식능력(self-renewal)과 특정한 조직 세포로의 분화능력(tissue-specific cell differentiation)을 가지고 있는 세포로 정의된다. 이런 줄기세포는 그 분화 가능성에 따라서 전 개체가 분화가능한 줄기세포(totipotent stem cell)와 모든 배엽의 세포로 분화 가능한 세포(pleuripotent stem cell), 그리고 각각의 특이 조직으로 분화 가능한 줄기세포(multipotent stem cell)로 개념적인 분류를 할 수 있다. 또한 얻을 수 있는 획득원에 따라서 배아줄



**Figure 3.** Results of immunofluorescence staining on the spindle shaped cells ( $\times 400$ ). A. CD90, B. CD105, C. CD102, D.  $\alpha$ -smooth muscle actin, E. intracellular cytoskeleton vimentine, F. CD13, G. Intracellular collagen type I in bone formation media non-treatment group, H. Intracellular collagen type I in bone formation media treatment group.



**Figure 4.** Expression of alkaline phosphatase in spindle shaped cells. A. bone formation media non-treated group ( $\times 100$ ). B. bone formation media treated group ( $\times 100$ ).



**Figure 5.** The expression of mRNA of alkaline phosphatase, type I collagen, *cbfa-1* and osteocalcin were checked in bone formation treated and non-treated groups of passage 3 stage of multipolar shaped adherent cells.

기세포(embryonic stem cell)와 신생아줄기세포(neonatal stem cell) 및 성인줄기세포(adult stem cell)로 분류한다. 배아줄기세포는 수정 후 5일째 공동이 형성된 배아에서 바깥쪽의 태반으로 분화하는 세포를 제거하고 안쪽의 태아로 분화하는 약 30~34개의 세포를 얻어서 배양한 세포(12)를 말한다. 배아줄기세포는 분화능력이 매우 뛰어나서 거의 모든 종류의 세포가 분화될 수 있는 것으로 생각된다(13,14). 그러나 이런 분화능력에도 불구하고 수정란이나 사산된 태아를 사용하는 윤리적인 문제점 때문에 아직 사회적으로 용인되지 않았으며 특정 세포로 분화한 후에도 종양조직(예, teratoma)으로 변할 가능성이 있다. 성인줄기세포는 조혈모 줄기세포, 신경줄기세포, 표피줄기세포, 중간엽줄기세포 등 다양한 조직에서

얻을 수 있다. 이런 줄기세포들은 각각의 조직에 국한된 세포들만 분화될 수 있는 것으로 알았으나 최근의 연구에 의하면 다양한 분화가능성이 있는 것으로 되어 있다. 조혈줄기세포에서는 혈액(15), 혈관내피세포(16), 간세포(17), 근육세포(18) 등이 분화가능한 것으로 되어있으며 신경줄기세포에서는 여러 가지 신경세포뿐만 아니라 혈액세포(19,20)도 분화한다. 중간엽 줄기세포는 골, 연골, 건, 지방, 근육, 골수기질, 신경세포 등(21-23)으로 분화 가능한 것으로 되어 있다. 그러나 이런 가능성에도 불구하고 줄기세포를 얻을 때 공여자에게 손상을 줄 수 있으며 타인에게 공여할 때 감염과 면역반응의 문제가 있으며 이미 상당히 분화된 상태이기 때문에 telomere의 길이가 짧고 증식능력이 저하되는 것으로 알려져 있다(24). 반면에 태반이나 탯줄혈액에서 얻을 수 있는 신생아줄기세포의 경우 구하기가 쉽고 감염의 위험성이 적으며 telomere의 길이가 길고 증식능력이 뛰어나다. 또한 조혈모세포 이식의 경우에서 이식편대숙주병(GvHD)의 발생빈도가 낮고 정도가 약한 것으로 알려져 있다(25). 제대혈에서 분리한 단핵세포를 일정시간 분리하면 여러 종류의 세포가 접착하여 증식하며 초기에 대부분을 차지하는 세포는 원형 세포(round shaped cells)이고 면역형광염색에서 CD45가 강하게 발현되며 이들 세포는 배양일수가 지날수록 세포의 증식보다는 여러 세포들이 융합되어 다핵세포가 되는 양상을 보여주었다. 방추형의 세포들(spindle shaped cells)은 다른 세포들에 비하여 증식속도가 매우 빠르며 초기에는 세포질이 적은 형태의 군락을 이루다가 점점 세포질이 풍부해지면서 섬유아세포와 비슷한 형태를 갖는다(Fig. 1). 또한 trypsin에 민감하게 반응하여 제대배양 시 쉽게 재부유할 수 있었다. 이들 세포는 표면 항원으로 CD13, CD90, CD105,  $\alpha$ -평활근 actine이 발현되었고(Fig. 3) 이 중 CD13은 aminopeptidase N으로서 과립구에도 공통적으로 발현된다. CD90은 Thy-1으로도 불리며 T세포와 신경세포에 많이 발현되는 것으로 되어 있고 T세포에서의 신호전달체계에 관여하는 것으로 알려져 있다. Thy-1 결핍쥐의 경우 일부 신경계의 결함이 있는 것으로 알려졌으나 형태학적인 변화와 T세포의 기능적인 결함은 없는 것으로 알려져 있어 아직까지 그 기능이 명확하지는 않다(26). CD105는 transforming growth factor (TGF)-beta의 수용체 3이며(3) 골세포와 연골세포의 분화에 중요한 역할을 하는 골형성단백질 bone morphogenic protein (BMP)과 transforming growth factor beta는 구조적인 연관성(27)이 있으므로 중간엽 줄기세포의 분화에 필수적인 표면항원으로 생각된다. 그러나 항원에 대한 항체의 흡착성(affinity)에 있어서 CD105는 상대적으로 낮으며 CD90은 매우 강하게 발현하는 것을 확인하였다.

골형성배지는  $\alpha$ -MEM에 덱사메타손(dexamethasone)

과  $\beta$ -glycerophosphate, ascorbic acid이 첨가되어 있고  $\beta$ -glycerophosphate, ascorbic acid는 콜라겐합성에 필요한 물질이다. 골수에서 분리한 중간엽 줄기세포에 덱사메타손을 처리했을 때 TGF- $\beta$ 에 의한 유전자 발현과 파이브로넥틴(fibronectin)의 발현은 감소하며 제1형 콜라겐의 발현은 증가하는 것으로 알려져 있다. 반면에 일반적인 섬유아세포에서는 특별한 반응을 보이지 않는 것으로 되어 있다(28).

골세포가 성장하는 것을 확인할 수 있는 표지자로서는 골 alkaline phosphatase와 제1형 콜라겐(29), *cbfa-1* (30) 및 오스테오칼신(osteocalcin)이 있다. Alkaline phosphatase는 골, 간, 내장, 신장, 태반에 발현되며 본 연구에서와 같이 특이조직이 없는 상황에서 골형성배지를 첨가하였을 때 alkaline phosphatase 수치가 급격히 증가되면 골세포로 분화되었다고 할 수 있다. Fig. 4에서와 같이 골형성배지를 첨가하지 않은 군에서는 alkaline phosphatase 염색에서 약하게 반응을 나타낸 반면 골형성배지를 처리한 군에서는 강하게 반응하는 것을 볼 수 있었으며 RT-PCR에서도 비처리군에 비하여 처리군에서 상대적으로 강하게 발현하는 것을 볼 수 있었다. 제1형 콜라겐의 변화는 세포내 염색에서 immunophenotyping과 면역형광 염색 및 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 세포내 immunophenotyping 결과는 10일째까지 제1형 콜라겐이 증가함을 확인하였으며 10일 이후에는 0.1% collagenase를 사용하여 세포를 떼어낼 수 있었으나 세포들이 응집되어 있어서 immunophenotyping분석을 실시할 수 없다. 이를 보완하기 위하여 면역형광염색과 RT-PCR을 통하여 확인하였다. *cbfa-1*은 조골세포의 분화 초기에 발현하는 유전자로 알려져 있으며(31) Fig. 5의 mRNA의 발현에서 골형성배지 처리 초기에 발현하는 것을 보여주었다. 오스테오칼신은 조골세포형성 시 증가하는 marker로 알려져 있으며(29) RT-PCR결과에서 골형성 배지 처리군과 비처리군에서 모두 발현됨을 확인할 수 있었다. 조골세포의 분화는 3단계로 분류하며 초기의 증식기에 제1형 콜라겐이 증가하며 기질형성기에 alkaline phosphatase 및 오스테오칼신의 발현이 증가하고 마지막에는 미네랄형성기를 거쳐 세포사멸양상을 보이는 것으로 알려져 있다(32). 본 실험의 mRNA발현 확인실험에서는 3번째 제대배양의 세포를 이용하였으며 골형성배지 처리군에서는 초기에 alkaline phosphatase와 제1형 콜라겐 및 오스테오칼신이 강하게 발현하였다. 이에 반하여 골형성배지를 처리하지 않은 군에서는 계속 일정하게 발현이 증가하는 양상을 보여주었으며 이는 세포배양배지에 첨가되어 있는 소량의 ascorbic acid와 FBS 내에 함유된 dexamethasone 등의 효과에 의한 것으로 추정된다. *cbfa-1* mRNA는 골형성배지 처리 후 1일째 갑자기 증가하는 양상을 보여 주었으며 골형성배지를 처리하지 않

은 군에서는 점점 증가하는 양상을 보여 주었다.

본 연구에서 계속 증식하는 세포를 분리하였고 이들 세포의 표면항원특성은 골수에서 얻은 중간엽 줄기세포의 성장과 일치하였다. 골형성 분화배지를 처리하면 골조직 특이세포로 분화하므로 본 연구자들이 분리하여 사용한 세포가 줄기세포임을 알 수 있었다. 이런 줄기세포는 세포치료제로 활용될 수 있다.

노화가 진행됨에 따라 수반되는 골다공증에 인한 골절이나 골절치유 시 감염으로 인한 불유합 골절, 대퇴부 골두의 세포수 감소로 인한 무혈성골괴사증과 같은 만성골질환의 치료는 근원적인 골세포수의 증가가 아닌 약물과 침상안정과 같은 대증요법에 의존하고 있다. 이와 같은 질환의 근원적인 치료법으로 골세포의 이식을 생각할 수 있다. 여기에 동반하는 문제로서 면역학적인 거부반응을 생각할 수 있으나 중간엽줄기세포의 경우 구조적적합성항원 중 Class II가 발현되지 않으며 이식시 발생하는 면역반응의 정도가 미약할 것으로 생각된다. 또한 줄기세포는 B 세포(33)와 T 세포(34) 및 여러 과립구들(35)의 성장을 조절하는 기질세포로서의 역할이 있으므로 면역거부반응이 적을 것으로 생각된다. 또한 제대혈의 경우 미리 구조적적합성항원의 형별을 통하여 이식 시의 거부반응을 최소화할 수 있다는 장점이 있다.

세포치료제 이외에도 줄기세포는 계속 증식하면서 정상조직과 같은 성질을 갖게 되므로 새로운 치료방법의 개발에 적합한 재료가 될 수 있을 것이며 아울러 세포의 정상적인 발달에 미치는 여러 가지 환경적인 요소들을 비교할 수 있으므로 질병 발생에 대한 환자 개인의 습관과 주변환경의 영향 등을 확인할 수 있는 새로운 모델을 제시할 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

- Kirschstein R: Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions., p 1-3, Department of Health and Human Services. <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>, 2001
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP: Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92; 7844-7848, 1995
- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA: Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 185;98-106, 2000
- Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276;71-74, 1997
- Ye ZQ, Burkholder JK, Qiu P, Schultz JC, Shahidi NT, Yang NS: Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 91; 12140-12144, 1994
- Erices A, Conget P, Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109; 235-242, 2000
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4;267-274, 1976
- Minguell JJ, Erices A, Conget P: Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226;507-520, 2001
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7;211-228, 2001
- Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK: Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 938;208-218;discussion 218-220, 2001
- David C, Reiner C, Carla M, Darwin J: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow Center for Gene Therapy. MCP Hahnemann University, p 19102-11192, Philadelphia, 2001
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S: Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9;2110-2117, 1994
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282;1145-1147, 1998
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95;13726-13731, 1998
- Fukushima N, Ohkawa H: Hematopoietic stem cells and microenvironment: the proliferation and differentiation of stromal cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 20;255-270, 1995
- Lansdorp PM: Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 23;187-191, 1995
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284;1168-1170, 1999
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401;390-394, 1999
- McKay R: Stem cells in the central nervous system. *Science* 276;66-71, 1997
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283; 534-537, 1999
- Caplan AI: The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 21; 429-435, 1994
- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG: Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 97;561-570, 1997
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96;10711-10716, 1999
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human

- synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44;1928-1942, 2001
  25. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, McGlave PB, Sender L, Cairo MS: Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 88;795-802, 1996
  26. Killeen N: T-cell regulation: Thy-1-hiding in full view. *Curr Biol* 7;R774-777, 1997
  27. Yamaguchi A: Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily. *Semin Cell Biol* 6;165-173, 1995
  28. Dieudonn inverted question marke SC, Kerr JM, Xu T, Sommer B, DeRubeis AR, Kuznetsov SA, Kim IS, Gehron Robey P, Young MF: Differential display of human marrow stromal cells reveals unique mRNA expression patterns in response to dexamethasone. *J Cell Biochem* 76;231-243, 1999
  29. Garnerio P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD: Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 79;1693-1700, 1994
  30. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G: *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89;747-754, 1997
  31. Ducy P, Schinke T, Karsenty G: The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289;1501-1504, 2000
  32. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA: Principles of bone biology, p 69-86, Academic Press, 1996
  33. McGinnes K, Quesniaux V, Hitzler J, Paige C: Human B-lymphopoiesis is supported by bone marrow-derived stromal cells. *Exp Hematol* 19;294-303, 1991
  34. Touw I, Lowenberg B: Production of T lymphocyte colony-forming units from precursors in human long-term bone marrow cultures. *Blood* 64;656-661, 1984
  35. Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S: Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 84;1110-1149, 1999
-